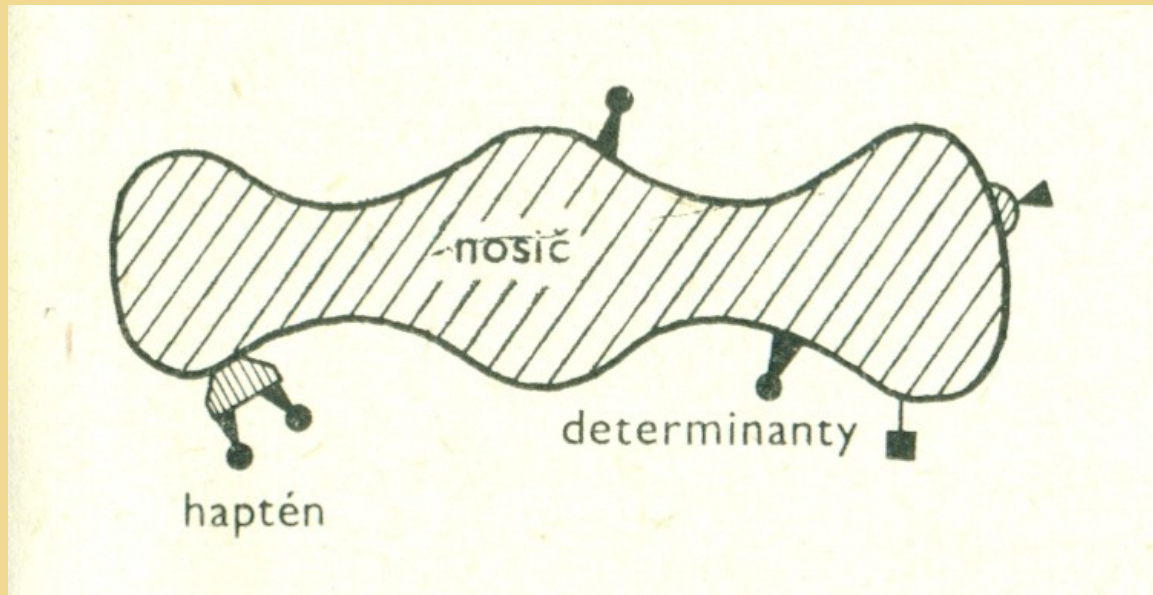


Imunochemické techniky

Miroslava Beňovská

Antigeny

- Látky schopné vyvolat v živém organismu tvorbu specifických protilátek
- Imunitní odpověď může vyvolat pouze kompletní antigen - imunogen
- Nekompletní antigen – haptén (např. léky, nízkomolekulární peptidy, hormony, aj.) – vyvolá tvorbu protilátek pouze tehdy, je-li navázán na bílkovinný nosič



Protilátky

- Bílkoviny vznikající v organizmu jako jeho odpověď na přítomnost antigenů
- Vykazují specifickou vazebnou aktivitu k antigenu, proti kterému byly připraveny
- Jsou to imunoglobuliny - v laboratorní praxi jsou obsaženy v tzv. antisérech
- Specifická a senzitivita imunoanalytických metod jsou ovlivněny používanou protilátkou

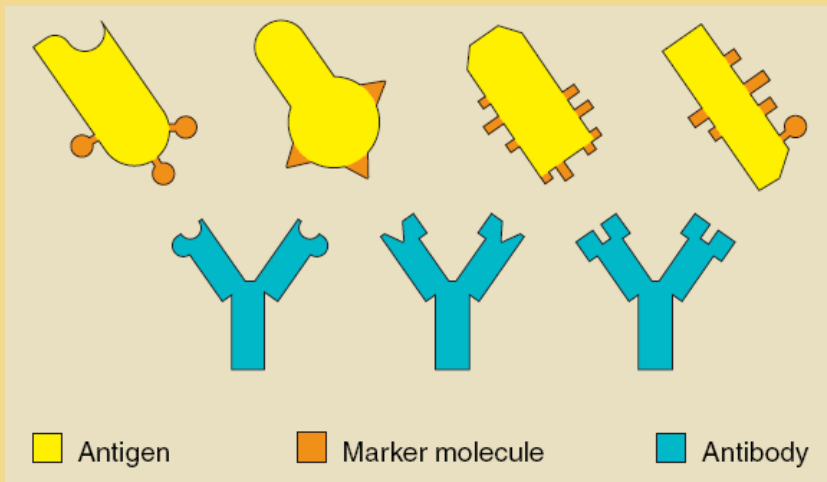
Protilátky:

- Používají se protilátky monoklonální a polyklonální
- **Monoklonální** protilátky – produkovány hybridony, které se připravují fúzí imunizovaných slezinných buněk s nádorovými
 - po vyčištění a selekci produkují jen jedinný typ protilátky
 - dosahuje se vyšší specificity, kontinuální produkce
- **Polyklonální** protilátky – připravují se imunizací zvířete, jsou vždy směsí protilátek, jsou schopny rozeznat i izoformy antigenu
 - mají proto vyšší citlivost
 - závisí na imunizovaném zvířeti, získání může být neopakovatelné
- Pro výslednou senzitivitu stanovení je podstatný také způsob detekce – dostatečnou citlivost mají např. luminiscenční metody

Antigeny a vazebná místa protilátek

Epitopy (antigenní determinanty):

- imunologicky aktivní oblasti imunogenu (antigenu) - přístupná místa na povrchu imunogenu
- velikost epitopů je určena velikostí vazebného místa pro antigen na protilátkové molekule (velikostí paratopu)



Vazba protilátky s epitopem zahrnuje slabé nekovalentní interakce

- fungují na krátké vzdálenosti, závisí na komplementaritě epitopu a paratopu, aby se tyto interakce maximalizovaly.

Faktory ovlivňující vazbu antigen-protilátka

- Afinita epitopu a paratopu dána silou nekovalentních interakcí, tj. vodíkovými můstky, disperzními silami, elektrostatickými silami
- Vazba je poměrně slabá, ovlivňovaná ionty přítomnými v reakční směsi, iontovou silou, nebo ději na rozhraní pevné a kapalné fáze (např. odtlačování molekul vody, adsorpce, kapilarita aj.)

Imunochemické techniky

- používají se imunochemické metody
- založeny na specifické reakci antigen – protilátka

Dělení:

- dle uspořádání reakce – **kompetitivní, nekompetivní** (sendvičové)
- dle prostředí
- **homogenní** imunoanalýza (stanovení a detekce přímo v reakční směsi – př. fluoroimunoanalýza, přístroj Kryptor, firma Brahms)
- **heterogenní** imunoanalýza (po separaci vytvořeného imunokompl.)
- dle techniky použité k měření signálu – **radioimunoanalýza, enzymoimunoanalýza, luminiscenční imunoanalýza, fluoroimunoanalýza**
- dle použité značky (**radioizotop, enzym, luminofory, fluorofory**) (neznačené metody – viz imunoturbidimetrie, imunonefelometrie)
- dle způsobu provedení: **jednostupňové - dvoustupňové**
manuální analýzy - automatizované analýzy

METODY STANOVENÍ

- **Imunoanalytické metody**

Detekce s vysokou citlivostí:

luminometrická (LIA, ILMA, CMIA, ECL)

fluorometrická (MEIA, FPIA, TRACE, DELFIA)

fotometrická – enzymová (EIA, ELISA, EMIT)

radioaktivní (RIA, IRMA)

Uplatnění pro **analyty s nízkou koncentrací**
(nmol/l, pmol/l)

Imunometody rozdělení

Homogenní analýzy

U této techniky není potřeba odstraňovat reaktanty - oddělovat nenavázanou protilátku (send.) či imunokomplex (komp.) – vše mimo vázaný komplex je inaktivní, nedává signál - stanovení a detekce probíhá přímo v reakční směsi. Je to rychlejší a jednodušší technika.

Heterogenní analýzy

Obě složky dávají signál, jednu nebo druhou je třeba oddělit

Luminiscenční

- Lumino Immuno Assay (**LIA**)
- Chemiluminescent Magnetic Immuno Assay (**CMIA**)
- Immuno Lumino Metric Assay (**ILMA**)
- ElectroChemiluminescence (**ECL**)

Fluorescenční

- Fluorescence Immuno Assay (**FIA**)
- Fluorescence Polarization Immuno Assay (**FPIA**)
- Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoro Immuno Assay (**DELFLIA**)
- Time Resolved Amplified Cryptate Emission (**TRACE**)

Enzymové - fotometrický princip

- **E**nzymo **I**mmuno **A**ssay (**EIA**)
- **E**nzyme **L**inked **I**mmuno **S**orbent **A**ssay (**ELISA**)
- **E**nzyme **M**ultiplied **I**mmunoassay **T**echnique (**EMIT**)
- **I**mmuno **E**nzyme **M**etric **A**ssay (**IEMA**)

Enzymoimunoanalýza

Enzymy

křenová peroxidáza

substrát peroxid vodíku, uvolněný kyslík
oxiduje bezbarvý chromogen
(o-fenylendiamin)

alkalická fosfatáza

substrát p-nitrofenylfosfát

glukozooxidáza

beta-galaktosidáza

Radiometrické

- Radio Immuno Assay (RIA)
- Immuno Radio Metric Assay (IRMA)
- Radio Enzymo Assay (REA)
- Radio Receptor Assay (RRA)

Citlivosti metod

Metoda	(g)
EMIT	10^{-6}
FIA, FPIA, EIA	10^{-9}
RIA, REA, IRMA	10^{-12}
LIA, ILMA	10^{-15}

Základní postup při imunoanalýze:

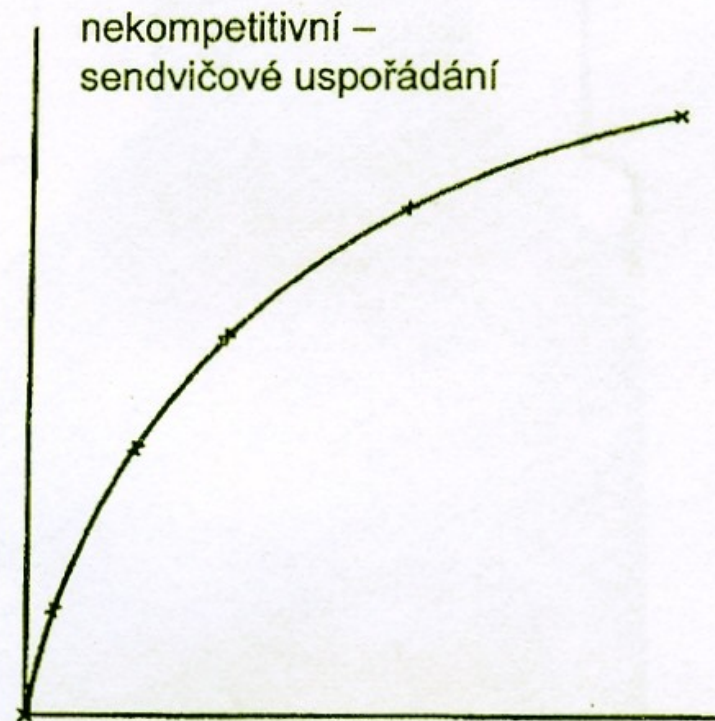
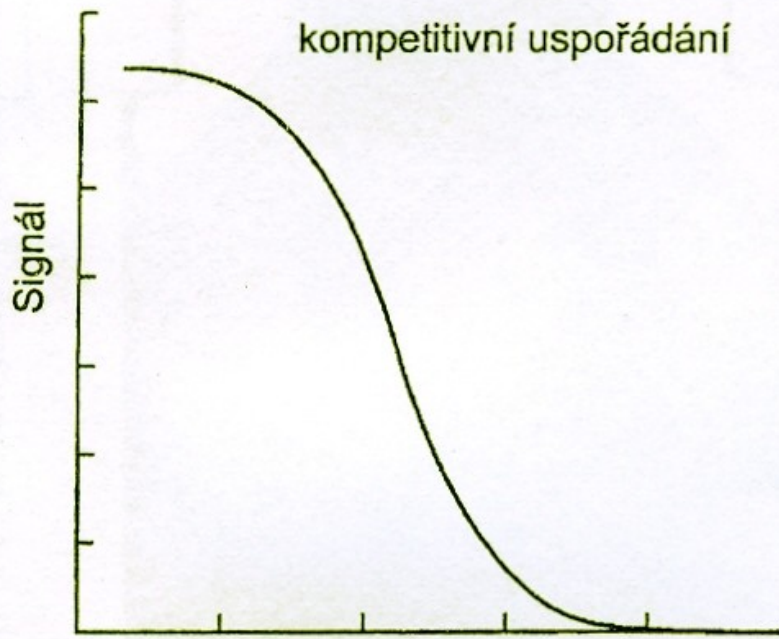
- smíchání komponent
- inkubace – vznik komplexu antigen - protilátka
- separace (v případě heterogenní imunoanalýzy, časté využití magnetu)
- reakce značenky komplexu antigen – protilátka s chemickou látkou startující reakci s detekovatelným efektem
- detekce (př. chemiluminiscence)

Kompetitivní stanovení:

- Stanovovaný antigen soutěží se stejným antigenem, na který je navázána značenka o limitované množství protilátky
- Velikost odezvy je nepřímo závislá na koncentraci stanovovaného analytu
- Kalibrační křivka má hyperbolický tvar
- Metoda je vhodná pro nízkomolekulární analyty s malou molekulou (př. B12, folát, teofylin, fenytoin T3, steroidní hormony)
- S výhodou se u ní používají polyklonální protilátky

Sendvičové stanovení:

- Stanovovaný antigen ze vzorku reaguje a dvěma protilátkami, které jsou v reakční směsi v přebytku
- Jedna protilátka bývá značená, druhá protilátka umožňuje separaci vznikajícího komplexu
- Velikost měřeného signálu je přímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu
(parabolický tvar kalibrační křivky)
- Metoda se používá pro molekuly s vyšší molekulovou váhou, které umožňují vazbu protilátek na dvě determinanty – př. TSH, ferritin, nádorové antigeny, PSA, S100, srdeční troponiny, osteomarkery
- Často se používají monoklonální protilátky



Analytická koncentrace

Heterogenní imunoanalýza

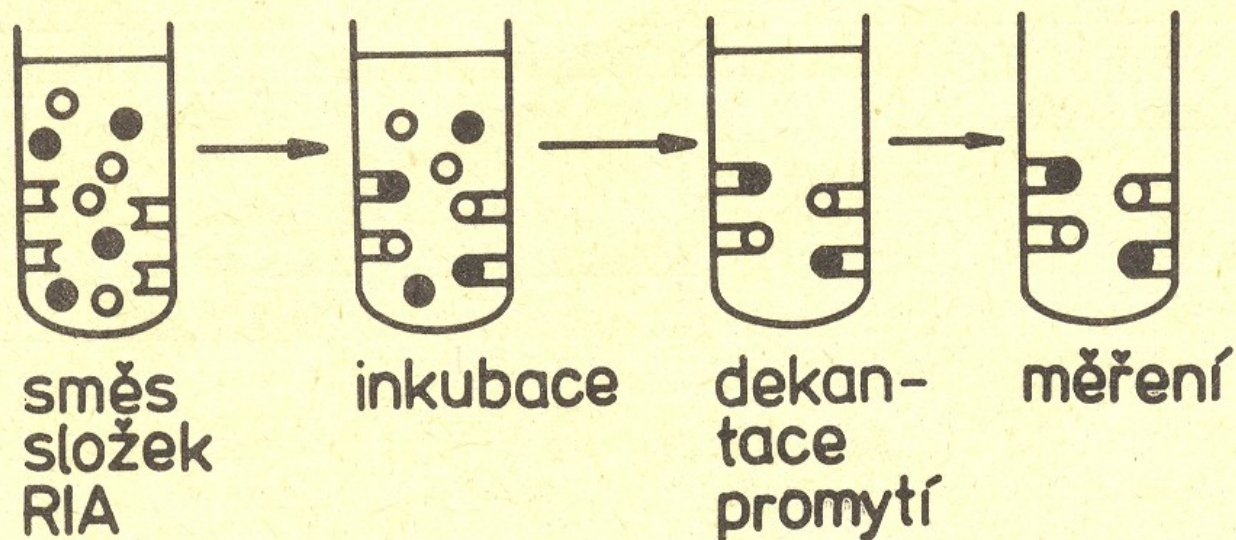
Radioimunoanalýza:

- Patří mezi heterogenní, ruční metody
- Nejstarší imunoanalytická metoda
- Od roku 1959
- Citlivá, náročná na ruční práci a na zachování předpisů při práci s radioizotopy
- Jako značka se používá izotop jódu ^{125}I - γ - zářič s poločasem rozpadu 60 dní (případně β - zářič trícium (^3H) s poločasem rozpadu kolem 12 roků)
- Kompetitivní uspořádání (RIA)
- Sendvičová metoda (IRMA – Imunoradiometrická analýza)
- Metodika je na ústupu, na většině pracovišť se nepoužívá

Schematické znázornění kompetitivního stanovení (RIA):

smíchání komponent, inkubace (vznik komplexu antigen-protilátka), separace (ukotvení komplexu na pevném nosiči a promytí) a detekce

- ▣ první protilátka
- značený antigen
- neznačený antigen



Příklad - stanovení 17-OH Progesteronu:

- Zvýšené hladiny 17-OHP v krvi nasvědčují vrozenému metabolickému onemocnění kongenitální adrenální hyperplasii (CAH)
- Principem stanovení je kompetitivní RIA ve zkumavkách potažených protilátkou proti 17-OHP
- Inkubace ve zkumavkách potažených protilátkou společně s 17-OHP značeným ^{125}I (radioindikátor)
- Odsátí obsahu zkumavek
- Měření radioaktivity navázaného komplexu ve zkumavce
- Koncentrace 17-OHP ve vzorcích se odečítá z kalibrační křivky

Detekce - scintilační detektor:

- Multidetektorový gama měřič LB 2104
- Kvantitativní měření radioaktivity gama záření radioaktivních nuklidů
- Založen na vzniku luminiscence při průchodu ionizujícího záření vhodnou látkou - scintilátorem
- Jako scintilační jednotka se používají krystaly NaJ/Tl , tj. jodidu sodného se stopami thalia
- Systém je vybaven 12 scintilačními jednotkami (sondami) a fotonásobičem
- Při průchodu záření gama scintilačním krystalem vznik fotoelektrického jevu a Comptonova rozptylu (foton vyráží elektron a ztrácí část energie)
- Elektrony uvolněné z atomových obalů excitují atomy krystalu
- Vzniká viditelné luminiscenční záření – scintilace
- Fotonásobiče - mění scintilaci na elektrické impulsy
- Lze měřit až 12 zkumavek současně

ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

- Patří k enzymové heterogenní imunoanalýze - enzym jako značka (křenová peroxidasa), ruční technika
- Enzymová imunoanalýza může být využívána také na imunoanalyzátorech (př. Immulite, Siemens, enzym ALP)
- Kompetitivní nebo sendvičové uspořádání
- Stanovení na mikrotitračních destičkách, potažených protilátkou
- Fáze stanovení jako u radioimunoanalýzy
- Pro usnadnění práce se využívají vícekanálové pipety a automatické promývací stanice
- Detekce - ELISA reader

Vysokoučinná promývačka mikrotitračních destiček (firma TECAN)



ELISA reader ELx800, firma BIO-TEKK
vertikální fotometr pro mikrotitrační destičky, měří koncentrace v celé destičce
současně



ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

- Nevýhodou stanovení je nutnost provedení vícebodové kalibrační závislosti při každém měření. Vzhledem k tomu, že metodika se v současnosti používá většinou pro vysoce speciální analyty, které nebyly dosud převedeny na automatické imunoanalyzátory, bývají vzorky skladovány, dokud se jich neshromáždí větší počet. Mikrotitrační destičky je možno rozložit na jednotlivé použky, takže není nutné zpracovat celou destičku.
- Na pracovištích, kde se provádí větší počet ELISA stanovení je možno zakoupit také systém, kde je pipetování, promývání i měření automatizováno (BRIO od firmy DRG).

ELISA

- Nevýhoda - provedení vícebodové kalibrační závislosti při každém měření
- Skladování vzorků, většinou se neprovádí denně
- Mikrotitrační destičky lze rozložit na jednotlivé proužky
- Možnost automatizace pipetování, promývání i měření (BRIO od firmy DRG)

Příklad ELISA - stanovení luteinačního hormonu:

- Sendvičová technika
- Jamky v mikrotitrační destičce potaženy monoklonální protilátkou proti LH - vychytává LH ze vzorku
- Druhá protilátka je polyklonální, značena křenovou peroxidasou
- Inkubace 1 h při 37 °C, pětinásobné promytí
- Přidat substrát tetrametylbenzidin - reaguje s enzymem
- Zastavení reakce kyselinou sírovou
- Intenzita zbarvení se měří při 450 nm

MEIA (Enzymová imunoanalýza na mikročasticích; Microparticle Enzyme Immunoassay)

- Technika patří mezi heterogenní enzymovou imunoanalýzu na mikročasticích s fluorescenční detekcí
- Immunokomplex značený enzymem (ALP)
- Jako fluorogenní substrát např.
4-metylumbelliferylfosfát (MUP) - s ním reaguje enzym (ALP) - vzniká 4-metylumbelliferon (MU) a po jeho excitaci vzniká fluorescenční záření
- Jako světelný zdroj se používá Hg-výbojka ($\lambda = 365 \text{ nm}$), MU emituje fluorescenční záření ($\lambda = 448 \text{ nm}$)

Luminiscenční imunoanalýza

(heterogenní) – automatické imunoanalyzátoary:

- Analyzátoary s přímou chemiluminiscenční detekcí rozšířené
- Vysoká citlivost - vhodné pro stanovení hormonů
- Luminofoary používané ke značení nemají interference v biologických materiálech
- Zavedení nové metody časově i finančně náročné, trvá několik let
- Nabídka metod bývá proto pozadu za technikou RIA a ELISA
- Výhodou je automatizace, případně provedení klinických a imunoanalytických metod z jedné zkumavky
- LIA - kompetitivní
- ILMA – nekompetitivní (sendvič)

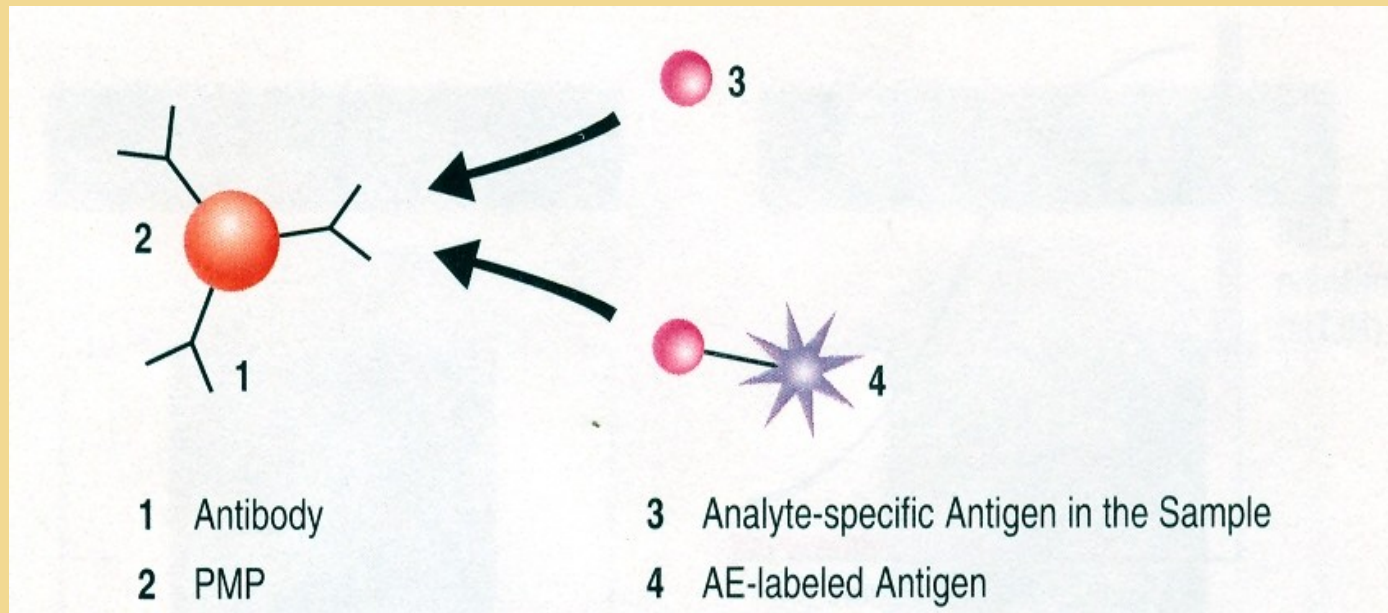
Chemiluminiscence – Centaur nebo Atellica IM 1300 resp. IM 1600, firma Siemens (Bayer)

Princip měření:

- Systém měří kvantitativní množství světla emitovaného během chemiluminiscenční reakce
- Pevná fáze jsou paramagnetické částice
- Značka - AE (acridinium ester) - chemiluminiscenční látka, která emituje světlo při oxidaci H_2O_2 v alkalickém prostředí
- Reakce probíhá během jedné sekundy, je velice citlivá (10^{-15})

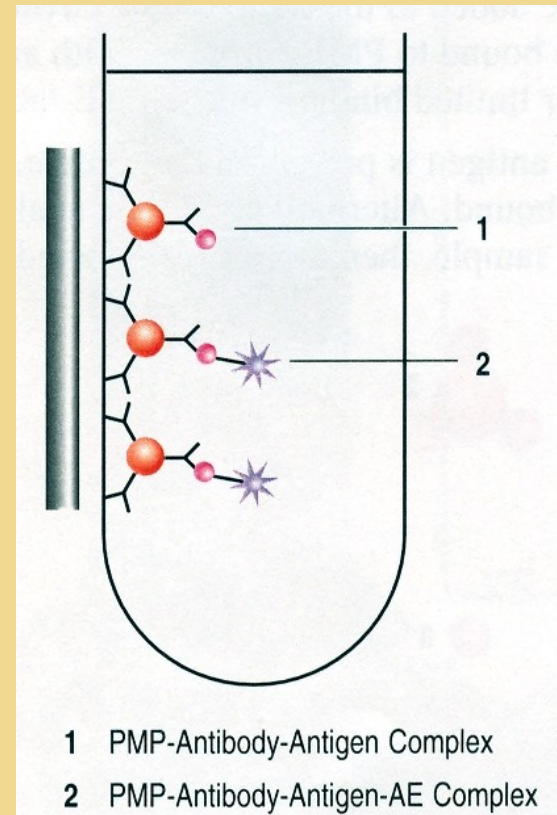
LIA - kompetitivní – př. stanovení estradiolu

- Estradiol ve vzorku soutěží s estradiolem označeným akridinium esterem o limitované množství králičí protilátky proti estradiolu
- Králičí antiestradiolová protilátka je navázána na myší protilátku proti králičímu IgG, která je spojena s paramagnetickými částicemi



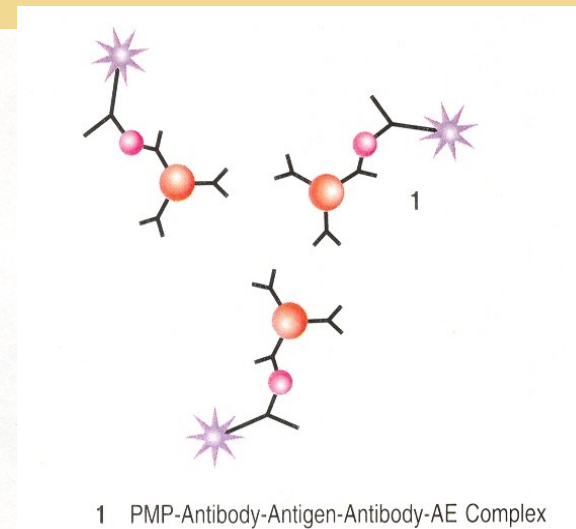
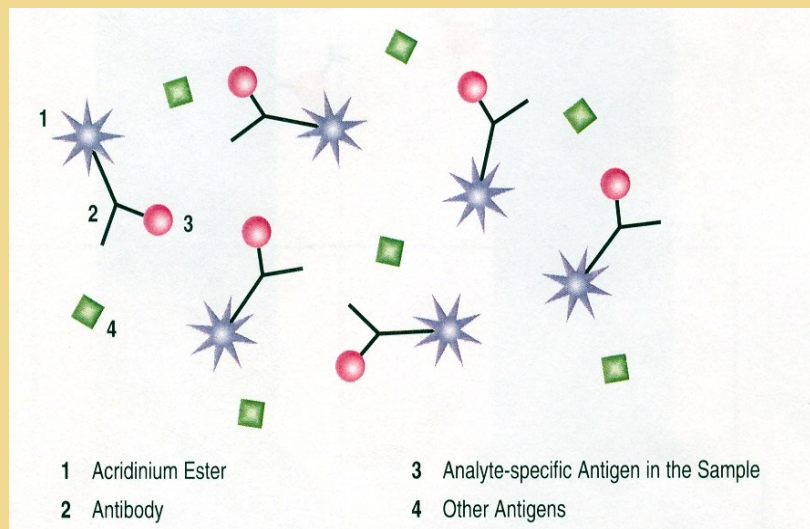
LIA kompetitivní – př. stanovení estradiolu

- Po inkubaci systém magneticky odseparuje komplex antigen – protilátky s paramagnetickými částicemi a promyje částice
- Dále se přidá peroxid vodíku a v luminometru NaOH, který inicializuje chemiluminiscenční reakci



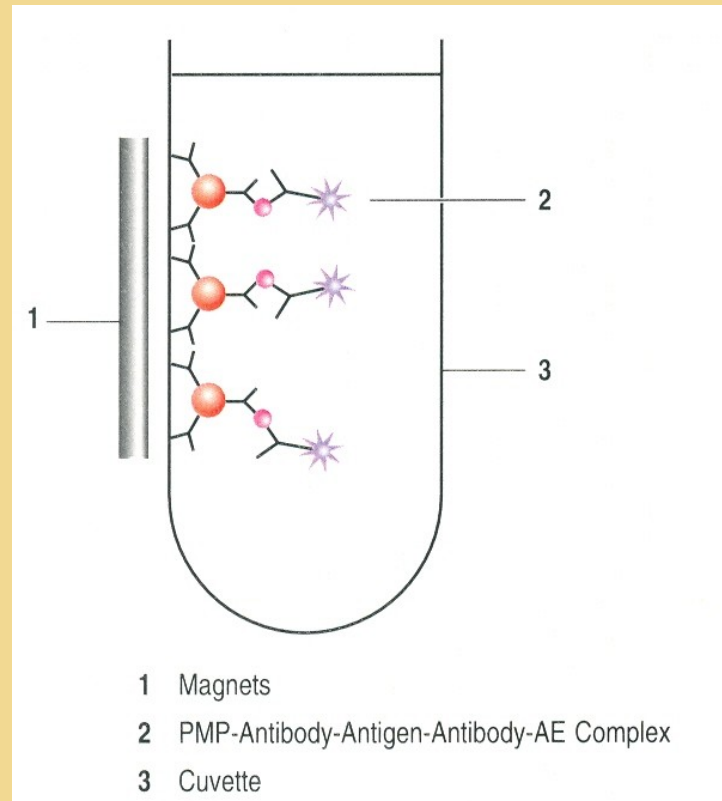
ILMA sendvičová – př.stanovení hCG

- Konstantní množství dvou protilátek.
- První polyklonální kozí protilátka proti hCG, označená acridinium esterem
- Druhá, monoklonální myší protilátka proti hCG kovalentně vázaná s paramagnetickými částicemi
- Obě protilátky specifické pro odlišné přítomné epitopy, free betasubjednotku a betasubjednotku intaktní molekuly



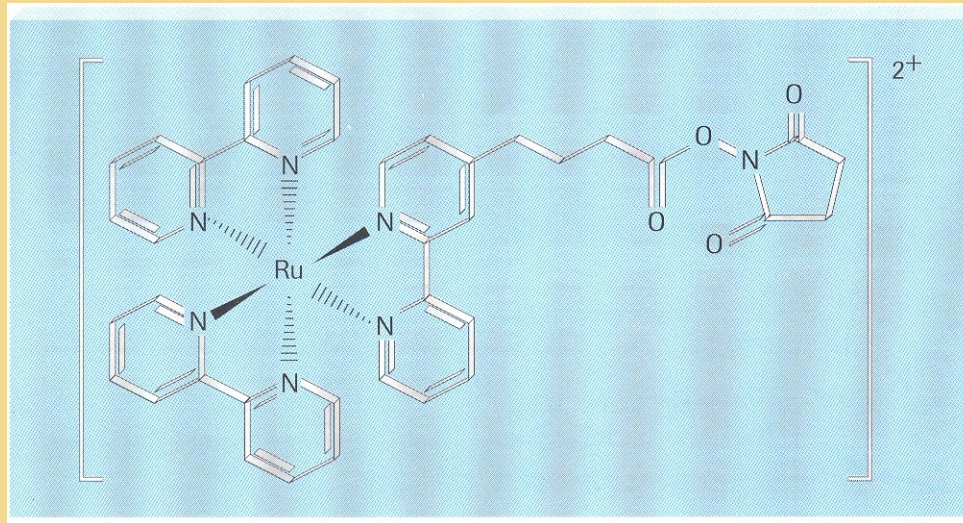
LIA sendvičová – př.stanovení hCG

- Po separaci, odsátí a promytí se opět dávkuje reagent a proběhne chemiluminiscenční reakce



Elektrochemiluminiscence – přístroj cobas e411 nebo cobas 8000 s modulem e801(Roche Diagnostic)

- Uspořádání metody – kompetitivní nebo sendvičové
- Protilátka nebo antigen biotynilovány
- Další specifická protilátka je značená rutheniovým komplexem



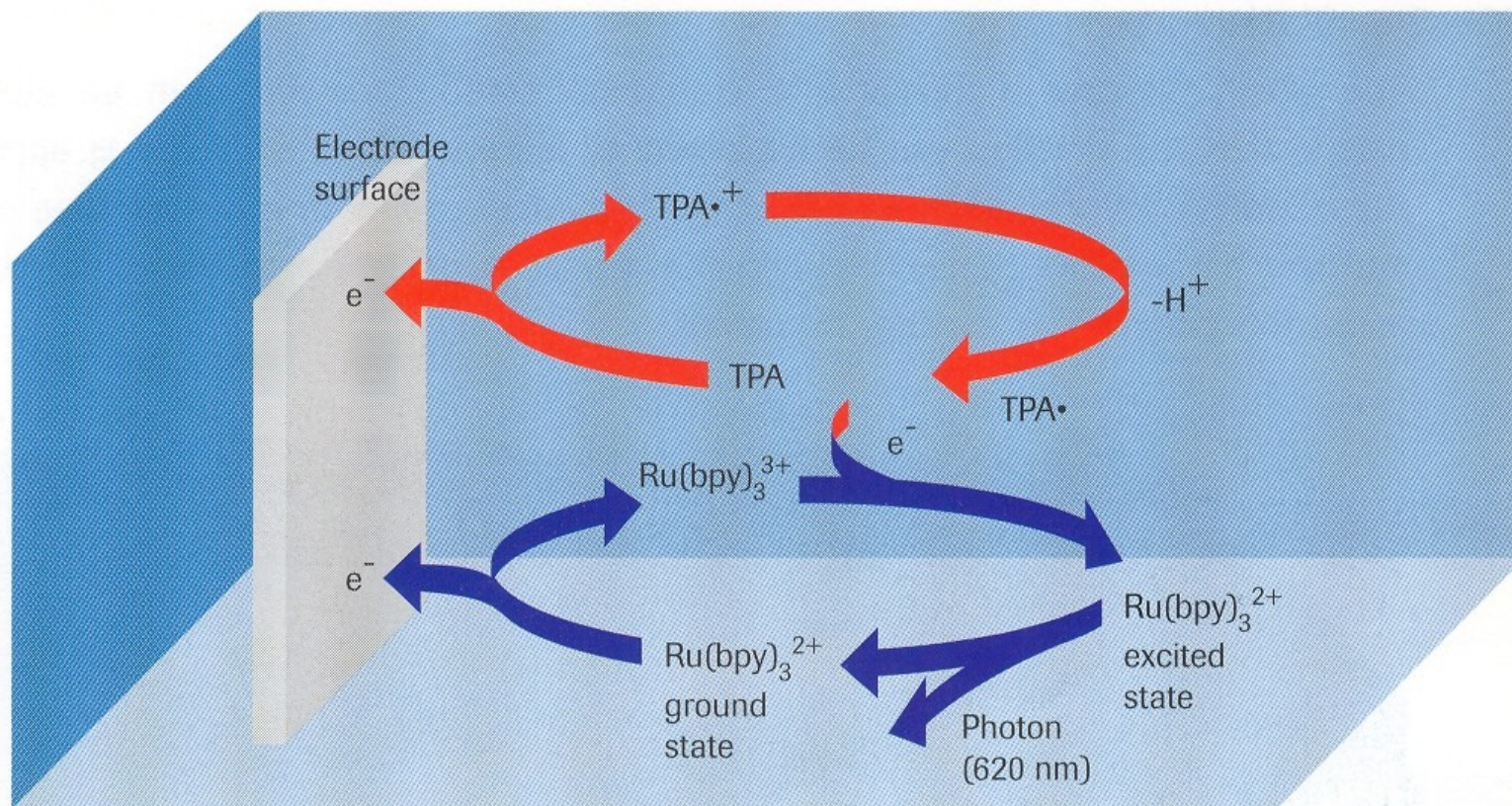
Rutenium(II) tris-bipyridylovým komplexem

Elektrochemiluminiscence – přístroj cobas e411, Cobas 8000 s modulem e801 (Roche Diagnostic)

Sendvičové uspořádání

- **Protilátky reagují s antigenem ve vzorku (např. TSH) za tvorby sendvičového komplexu**
- **Firma využívá většinou monoklonální protilátky**
- **Po přidání mikročástic potažených streptavidinem se komplex váže na pevnou fázi interakcí biotinu se streptavidinem**
- **Mikročástice se zachycují magnetickým polem na povrchu elektrody**
- **Po přidání substrátu tripropylaminu (TPA) a přivedení napětí na elektrody vzniká elektrochemiluminiscenční emise – ruthéniový komplex uvolní na elektrodě elektron za vzniku $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ kationtu**
- **Ruthéniový marker se po luminiscenční reakci regeneruje**

Elektrochemiluminiscence – přístroj cobas e411 nebo cobas 8000 s modulem e801 (Roche Diagnostic)



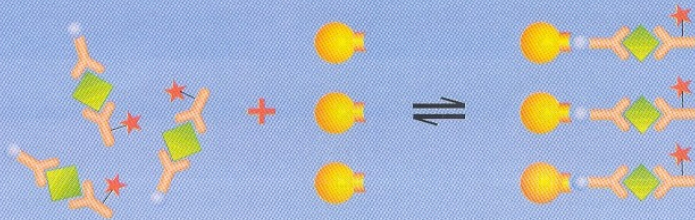
SANDWICH PRINCIPLE

FIRST IMMUNOLOGICAL REACTION

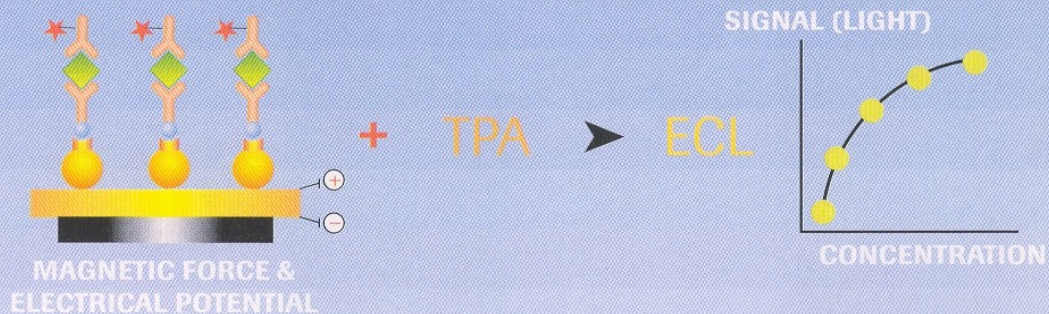


+ SERUM CONSTITUENTS

SECOND REACTION



LIGHT REACTION



 ANTIGEN

 RUTHENIUM LABELLED ANTIBODY

TPA TRIPROPYLAMINE

 BIOTINYLATED ANTIBODY

 STREPTAVIDIN-COATED MICROPARTICLE

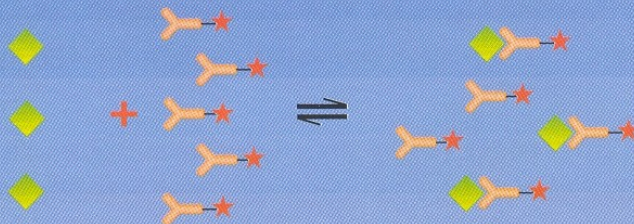
Elektrochemiluminiscence – přístroj cobas e411 nebo cobas 8000 s modulem e801 (Roche Diagnostic)

Kompetitivní uspořádání (např. stanovení fT4)

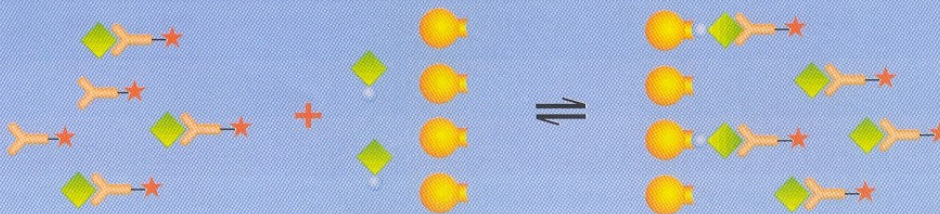
- soutěží stanovovaný antigen s biotynilovaným antigenem o limitované množství značené protilátky (polyklonální)
- Pouze komplex biotynilovaný antigen – protilátka se může vázat na paramagnetické částice
- Komplex stanovovaný analyt – protilátka je při separaci odstraněn
- Dále probíhá reakce stejně jako v předchozím případě
- Velikost signálu je nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného analytu

COMPETITIVE PRINCIPLE

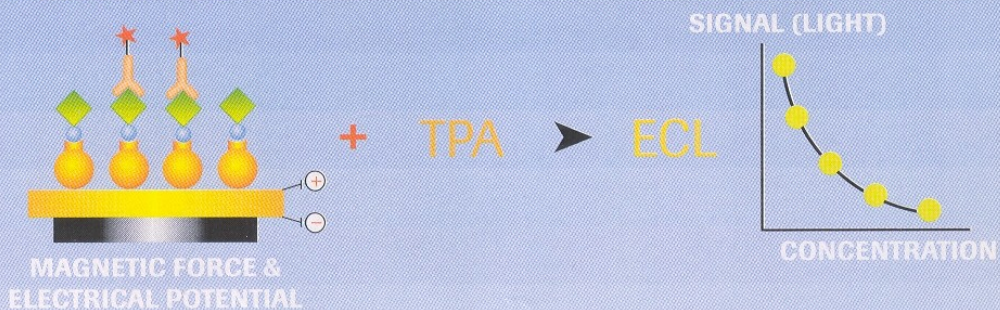
FIRST REACTION



SECOND REACTION




LIGHT REACTION



 ANTIGEN

 BIOTINYLATED ANTIGEN

 RUTHENIUM LABELLED ANTIBODY

 STREPTAVIDIN-COATED MICROPARTICLE

TPA TRIPROPYLAMINE

Technologie ChemiFlex CMIA (Abbott)

- CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay) chemiluminiscenční imunoanalýza na paramagnetických mikročásticích
- Značení patentovaným akridiniem
- Možnost dvou promývacích kroků (One Step, Two Step)

CMLA - princip

- Mikročástice (microparticles): mikročástice potažené rekombinantním antigenem ve fyziologickém roztoku s TRIS pufrem
- Konjugát :konjugát rekombinantních antigenů s akridiniem a monoklonální protilátkou proti příslušnému antigenu s akridiniem

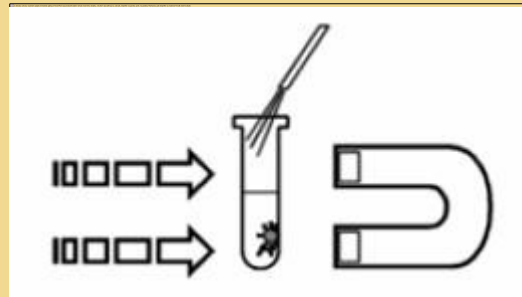
CMIA - princip

1. Dávkování paramagnetických mikročastic obalených záchyťovými molekulami do reakční nádoby se vzorkem
2. Inkubace v třepačce, analyt ze vzorku se naváže na záchyťové molekuly na mikročasticích – vznik imunokomplexu



CMIA - princip

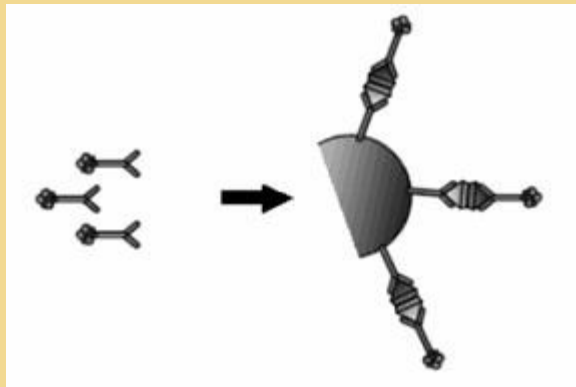
3. Po inkubaci přitáhne magnet paramagnetické mikročástice (navázané na specifický analyt) ke stěně reakční nádobky
Následuje proplach reakční směsi a odstranění nenavázané látky



Přitažení paramagnetických mikročástic magnetem

CMIA - princip

4. Příkladavek konjugátu značeného chemiluminiscenčním akridiniem
Konjugát se naváže na imunokomplex



Přidání akridiniového konjugátu

5. Inkubace
6. Promytí a odstranění nenavázaného analytu

CMIA - princip

7. Nadávkuje se Pre-Trigger (peroxid vodíku) a optický systém CMIA provede čtení pozadí
Pre-Trigger plní následující funkce:
 - vytváří kyselé prostředí, které zabraňuje předčasnému uvolnění emise světla
 - pomáhá předcházet shlukování mikročástic
 - slouží k odštěpení akridiniového barviva z konjugátu navázaného na komplex mikročásticeAkridiniové barvivo je připraveno pro další krok.
8. Do reakční směsi se nadávkuje Trigger (hydroxid sodný). Dojde k oxidační reakci a vzniku chemiluminiscence
Vzniká N-methylakridon a při návratu do základního energetického stavu uvolní energii ve formě emise světla
9. Obsah analytu je zjišťován na základě měření chemiluminiscenční emise

CMIA – stanovení kortizolu

- Jednokroková imunoanalýza, kompetitivní
- Vzorek se smíchá s paramagnetickými mikročásticemi potaženými protilátkami proti kortizolu
- Kortizol ze vzorku se naváže na protilátky proti kortizolu na mikročásticích
- Po inkubaci se do reakční směsi přidá konjugát kortizolu s akridiniem
- Konjugát soutěží o dostupná vazebná místa na mikročásticích potažených protilátkami proti kortizolu
- Po druhé inkubaci se mikročástice promyjí a do reakční směsi se přidají roztoky Pre-Trigger a Trigger
- Množství kortizolu ve vzorku je nepřímo úměrné jednotkám RLU (Relative Light Units), ve kterých se měří výsledná chemiluminiscenční reakce

Fluorescenční imunoanalýza

Fluorescenční enzymová imunoanalýza – RAD 120 (Radim)

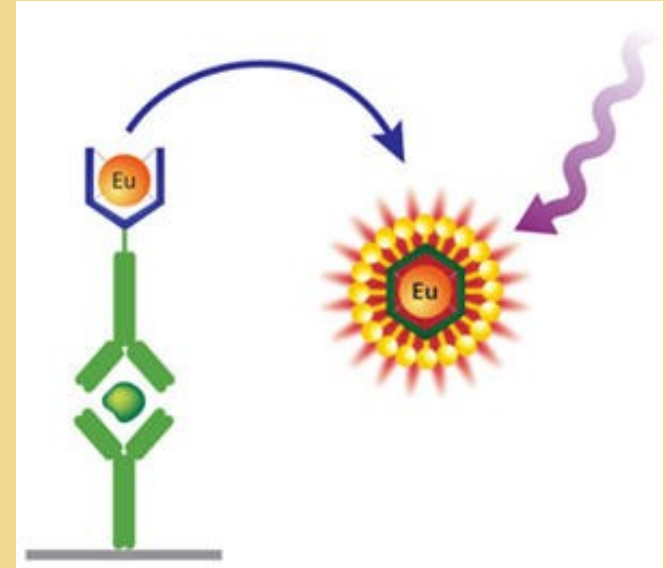
např. **Stanovení prolaktinu** (sendvič)

- ke vzorku a přidá polyklonální protilátka navázaná na magnetizovatelné částice
- a monoklonální protilátka proti prolaktinu značená alkalickou fosfatasou
- inkubace, promytí
- přidá se substrát – 4-methylumbelliferyl fosfát
- při další inkubaci vznik 4- methylumbelliferon
- fluorescence při 450 nm

DELFLIA

Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent ImmunoAssay

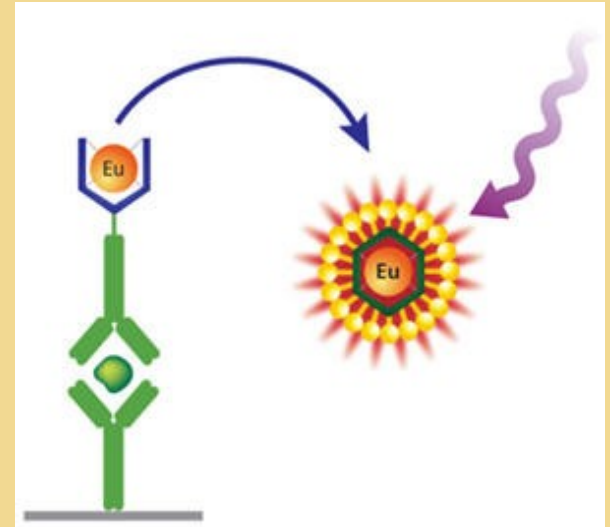
- Fluoroimunoanalytická heterogenní metoda vyvinutá (finskou firmou Wallac Oy)
- Velmi citlivá a specifická metoda pro stanovení nízko- i vysokomolekulárních analytů.
- využívá časově modulované měření fluorescence chelátu lanthanidů - Europium, Terbium, Sammarium..



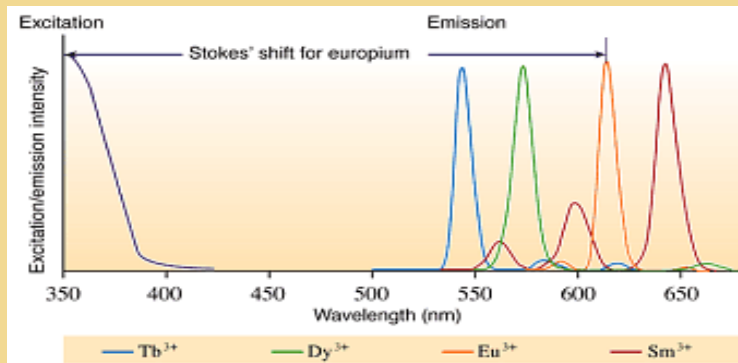
1	2	skupenství prvku třetí 2P C																18	19	20	elektronová konfigurace zinku										36	37	38	39	40		
3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40		
6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40			
7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40				
8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40					
9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40						
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40							
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40								
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40									
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40										
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40											
15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40												
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40													
17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40														
18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40															
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40																
20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40																	
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40																		
22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40																			
23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40																				
24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40																					
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40																						
26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40																							
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40																								
28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40																									
29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40																										
30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40																											
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40																												
32	33	34	35	36	37	38	39	40																													
33	34	35	36	37	38	39	40																														
34	35	36	37	38	39	40																															
35	36	37	38	39	40																																
36	37	38	39	40																																	
37	38	39	40																																		
38	39	40																																			
39	40																																				
40	40																																				

DELFLIA - princip

- Protilátka nebo antigen jsou označeny fluorescenční sondou – chelátem lanthanoidu, nejčastěji **Eu**ropia
- Po proběhlé imunochemické reakci se ke vzniklému komplexu přidává „zesilovací“ roztok, který při kyselém pH odtrhne **Eu** z komplexu a přemění jej na nový intenzivně fluoreskující chelát (reakce s novým luminogenním ligandem ze zesilovacího roztoku)



- fluorescence s velkým Stokesovým posunem fluorescenčního spektra (rozdíl mezi vlnovou délkou excitace a fluorescence)



- Vzorek je pulsně excitován zářením o vlnové délce 340 nm
- Fluorescence se měří v dlouhovlnné části viditelného spektra (Europium 620 nm).

DELFLIA

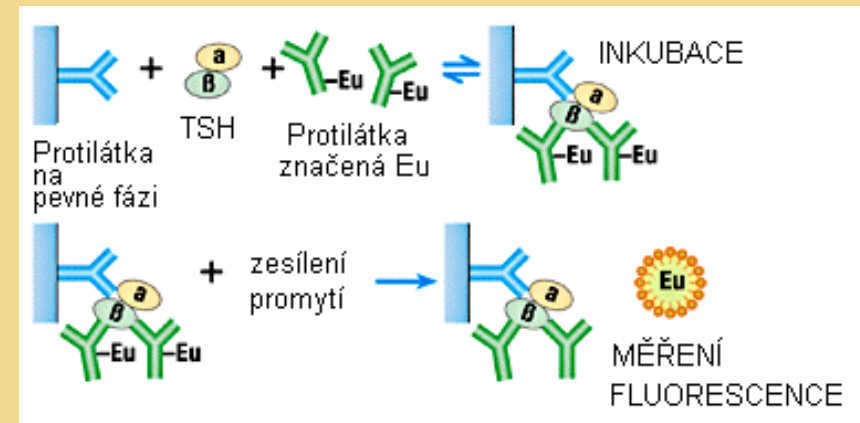
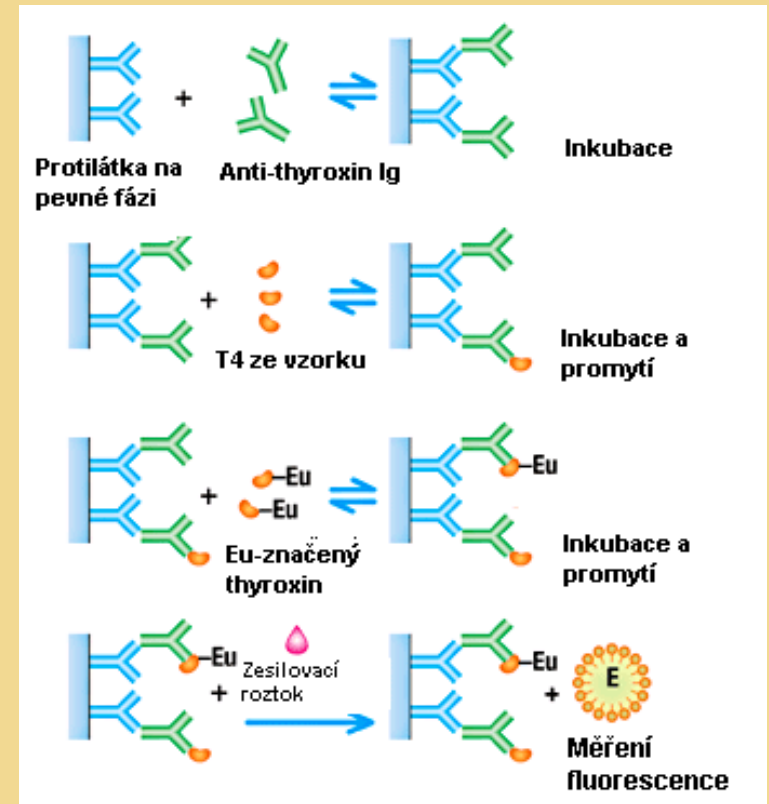
Uspořádání imunochemické reakce:

- kompetitivní:

- fluorescenční sondou značený antigen
- intenzita fluorescence nepřímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku

- nekompetitivní (sendvičové):

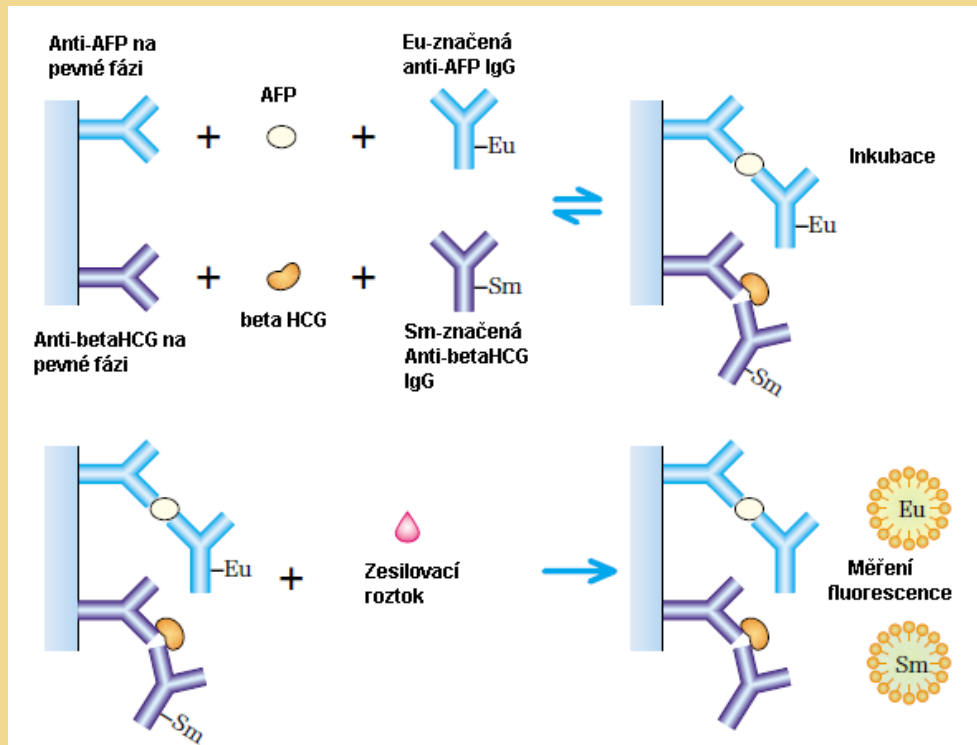
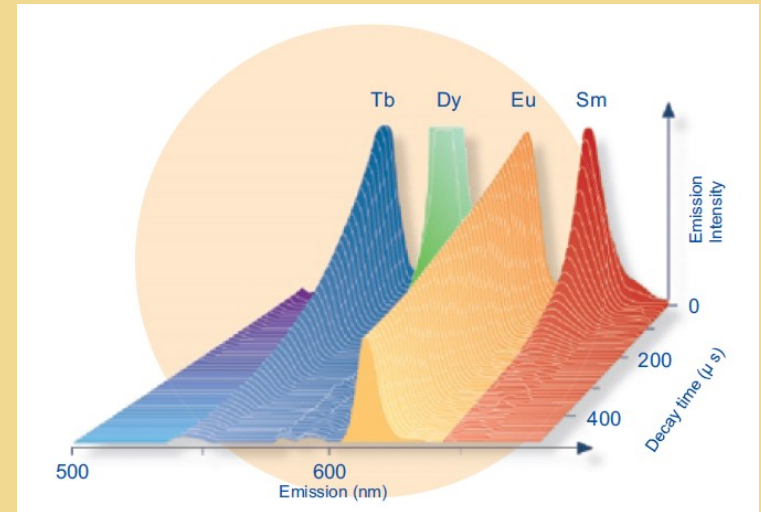
- fluorescenční sondou značená protilátka
- intenzita fluorescence přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku



DELFI^a - současné stanovení více analytů

Fluorescence lanthanidů:

- Úzké emisní píky při různých vlnových délkách (Europium - Eu 613 nm, Samarium - Sm 643 nm)
- Různá doba trvání fluorescence Eu, Sm



- Při měření se nepřekrývají vlnové délky ani časy odečtu fluorescence Eu a Sm - umožňuje současné stanovení dvou analytů

DELFI A - využití

DELFI A lze použít pro široké spektrum analytů (v principu lze lanthanidem označit každou stabilní sloučeninu obsahující aminoskupinu):

- Proteiny
- Peptidy
- Oligonukleotidy
- Malé organické molekuly (steroidy, aminokyseliny, léky,...)

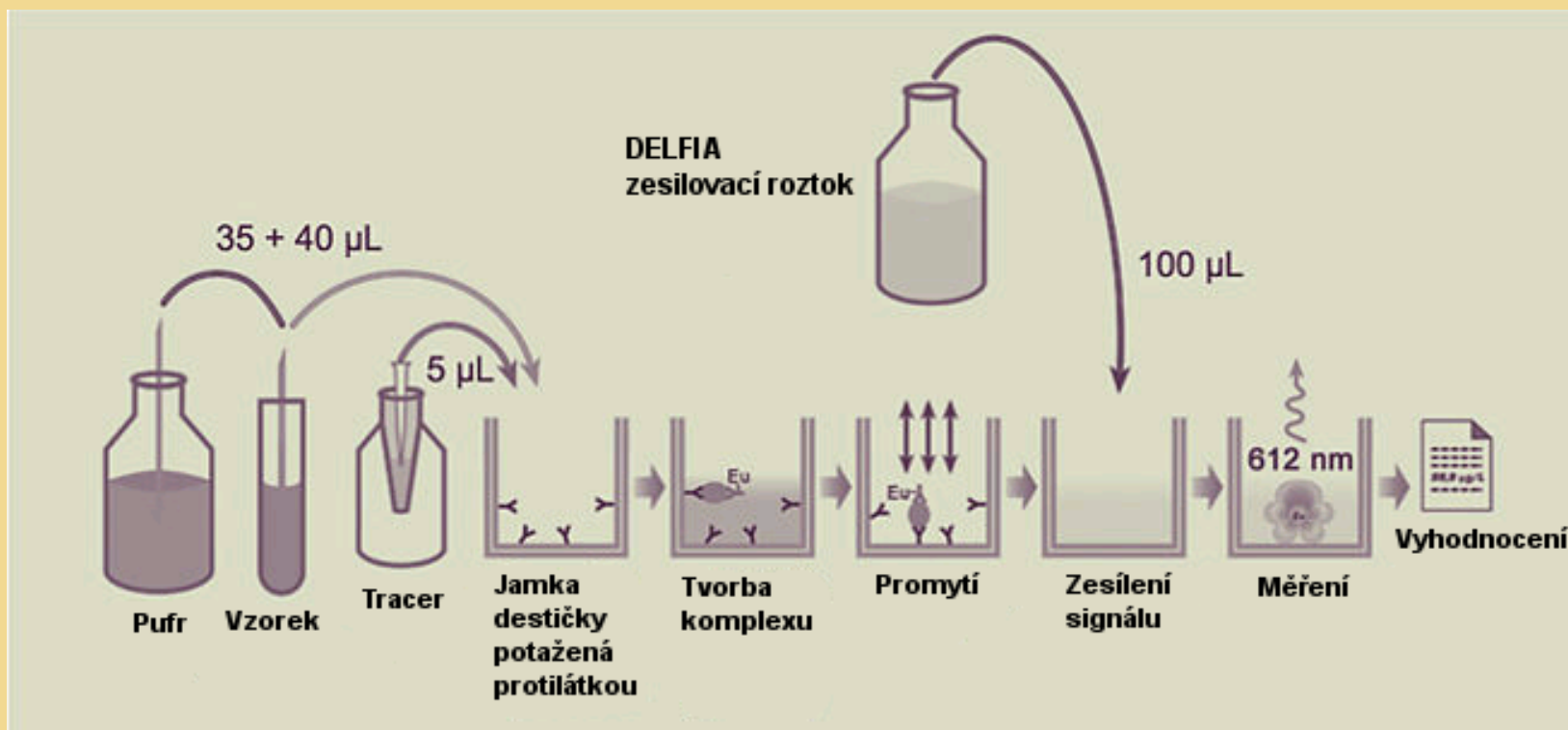
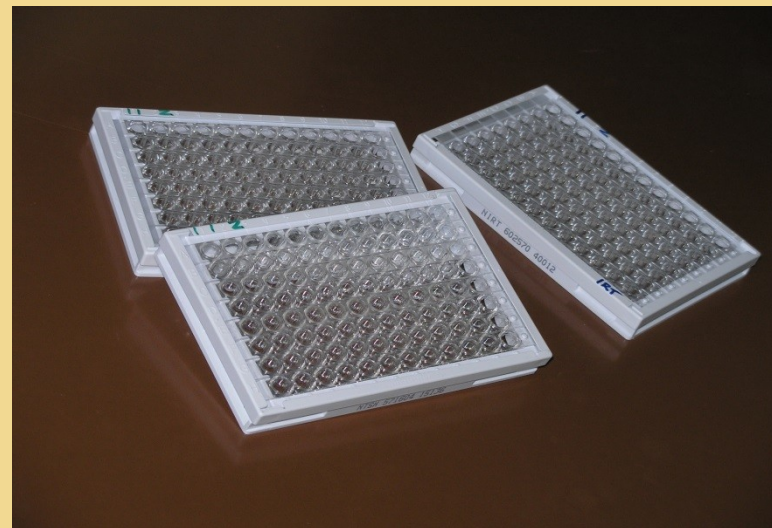
Novorozenecký screening (stanovení ze suché krevní skvrny):

- TSH (kongenitální hypotyreóza)
- 17-hydroxy-progesteron (kongenitální adrenální hyperplázie)
- Imunoreaktivní trypsinogen IRT (cystická fibróza)

DELFLA

praktické provedení

- Pracuje se v mikrotitračních destičkách v uspořádání 8x12 jamek se specifickou protilátkou (obvykle monoklonální) vázanou na pevné fázi



DELFLIA - linka



Autodelfia



HOMOGENNÍ IMUNOANALÝZA

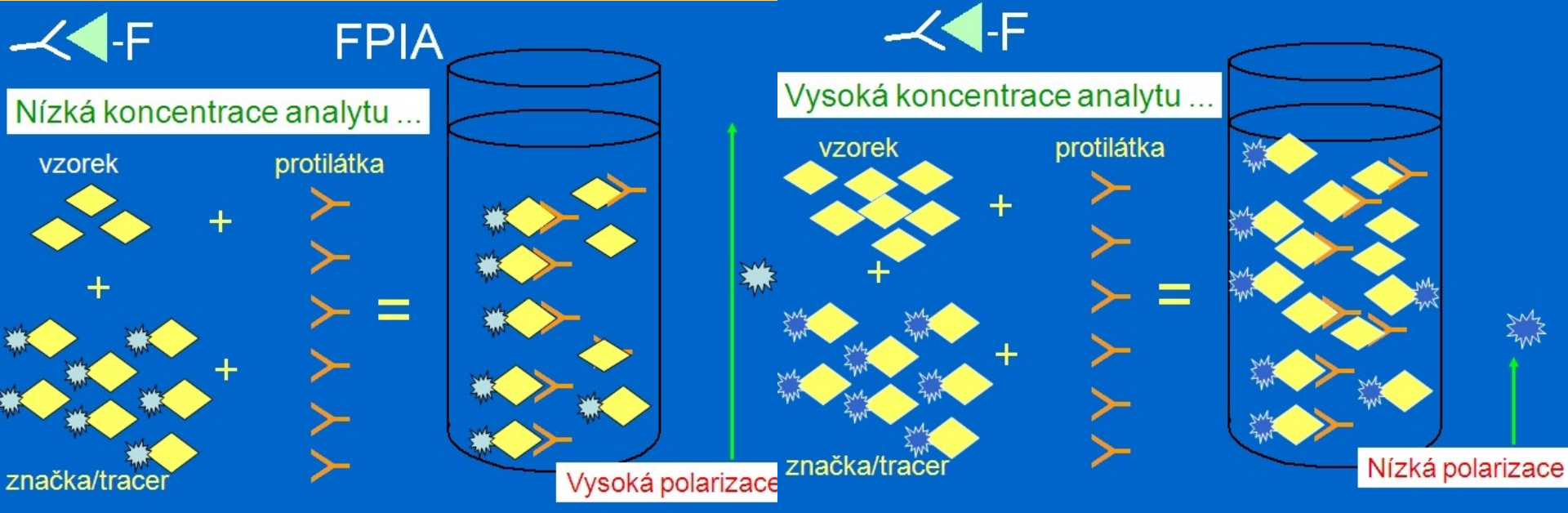
FPIA (Fluorescenční polarizační imunoanalýza; Fluorescence Polarization Immunoassay)

- Patří mezi homogenní kompetitivní imunoanalýzu
- Stanovovaný analyt a analyt značený fluoresceinem soutěží o vazebná místa na specifické protilátce
- K excitaci se používá lineárně polarizované světlo ($\lambda = 485 \text{ nm}$ - zdroj wolframová lampa + polarizační filtr)
- Při návratu molekuly fluoroforu do základní stavu se měří emise zeleného světla přes polarizační filtr
- Intenzita polarizovaného světla je nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu

FPIA (Fluorescenční polarizační imunoanalýza; Fluorescence Polarization Immunoassay)

- **Využívá různé rychlosti rotace velkých a malých molekul (imunokompl. a antigenu)- změna polarizace**
- **Malé molekuly (stanovovaný analyt a značený analyt) se otáčejí rychle, po excitaci polarizovaným světlem značený analyt emituje fluorescenční záření do mnoha směrů - naměří se pouze nízká intenzita tohoto záření**
- **Po vzniku velké molekuly (imunokomplex)-dojde ke snížení rychlosti rotace - emitované světlo kmitá ve stejné rovině jako excitující – naměří se vysoká intenzita záření**
- **Pro stanovení malých antigenů (např. léků,...)**

FPIA



Homogenní fluorescenční imunoanalýza – **TRACE** (Time Resolved Amplified Cryptate Emission) - Kryptor (Brahms)

Princip měření:

- Neradioaktivní přenos energie z donoru (kryptátová struktura s iontem europia v centru) na akceptor (chem. modif. protein)
- Měření signálu emitovaného z imunokomplexu s časovým zpožděním
- Měřený vzorek je ozářen dusíkovým laserem, následně donor (kryptát) emituje fluorescenční signál, po něm emituje signál akceptor

Odpadají promývací a separační kroky

Technologie LOCI - Siemens

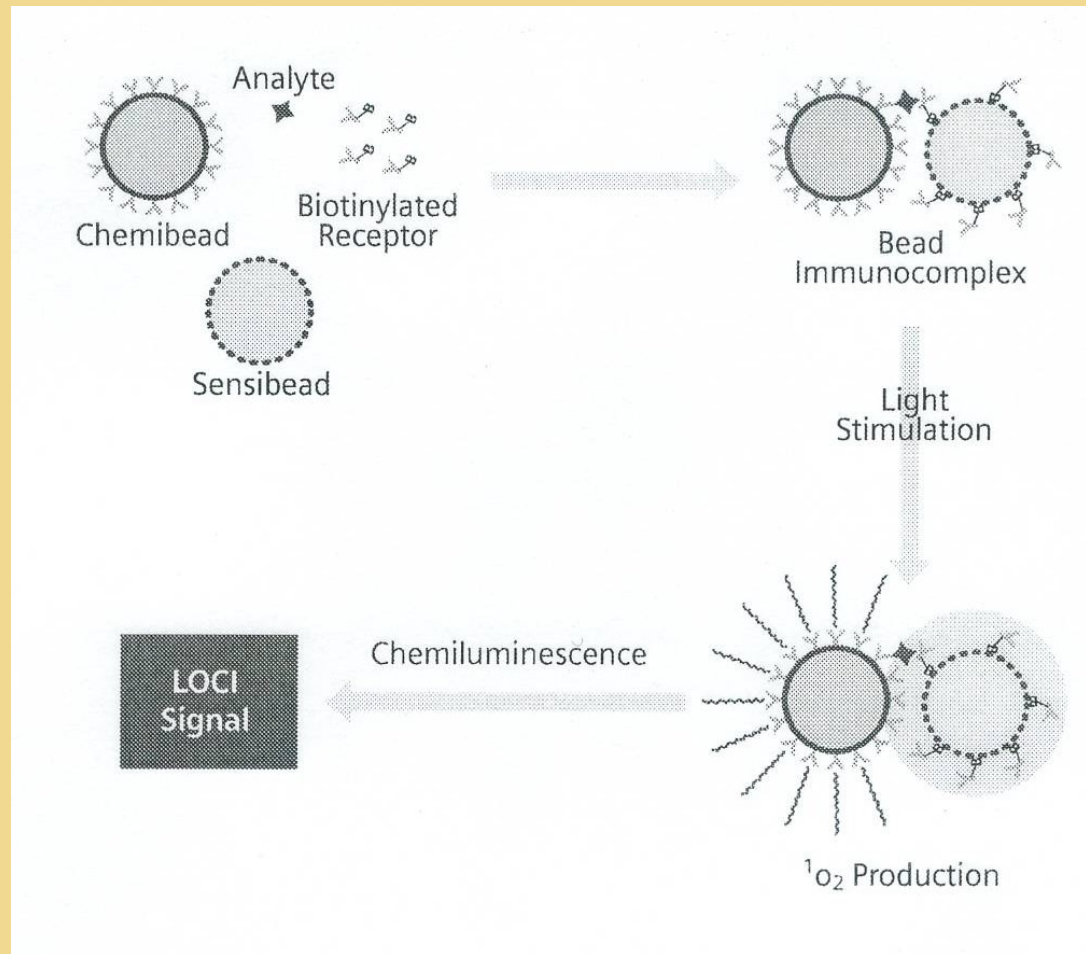
- Technologie založena na přenosu kyslíku
- První **homogenní** imunoanalytická metoda **s chemiluminiscenční detekcí** – novinka
- Vysoká citlivost
- Přístroj Dimension Vista 1500 Intelligent Lab Systém

Technologie LOCI - Siemens

Princip:

- **Dvě latexové kuličky**
 - jedna obsahuje olefinové barvivo a protilátku specifickou pro analyzovanou metodu (chemibead)
 - druhá je potažená streptavidinem a obsahuje barvivo, které generuje singletový kyslík (sensibead)
- **Do reakce dále vstupuje**
 - stanovovaný analyt
 - biotinylovaná protilátka specifická pro analyt.
- **Vytvoří se imunokomplex ze všech popsaných komponent.**
- **Po osvětlení komplexu se z **sensibead** uvolní singletový kyslík, pronikne do chemibead a uvolní chemiluminiscenční záření**

Technologie LOCI - Siemens



EMIT

- Homogenní, kompetitivní EIA
- Měří se aktivita **volného** enzymu **Ag^E**
(glukoso-6-fosfát dehydrogenáza)
- Enzym v imunokomplexu **Ag^E – Ab** je **inhibován**, změna v okolí značky
- **Ag^E** a **Ag^E – Ab** není třeba oddělovat
- Malé molekuly léky, drogy, mykofenolát
- Rychlost, jednoduchost provedení práce v jedné kyvetě, automatizace, přímá úměra
- Příklad – stanovení drog na přístroji Viva-E, Siemens

Nabídka drog prováděných na přístroji VIVA-E

Syva® Emit® DAT Assays

Amphetamines
6 Acetyl Morphine*
Barbiturate
Benzodiazepine
Cocaine Metabolite
Cannabinoid
Ecstasy
Ethyl Alcohol
LSD
Methadone
Methaqualone
Opiate
Phencyclidine
Propoxyphene

Imunoanalýza - video

https://is.muni.cz/auth/el/med/jaro2021/BLKB0422p/um/Imunoanaliza_08.mp4